

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.01.012

肝癌祖细胞在肝细胞癌发生中作用的研究进展

Research progress of hepatocellular carcinoma progenitor cells during hepatocarcinogenesis

张杨倩雯 综述; 王红阳, 陈磊 审阅 (海军军医大学第三附属医院 生物信号转导实验室, 上海 200433)

[摘要] 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界范围内最常见的原发性肝恶性肿瘤。当HCC患者出现明显症状时, 肿瘤往往已经是中晚期, 极大地影响了患者的生存质量。肝癌祖细胞(hepatocellular carcinoma progenitor cell, HcPC)是一种癌前病变中所含有的肿瘤起始细胞, 对HcPC的发生机制以及生物学功能进行系统阐述, 可能对HCC的早期诊断和干预治疗具有潜在的重要意义。近年来已有大量文献报道HcPC的生物标志物, 如CD44、EpCAM、SOX9、OV6以及CK19等在HCC发生中所发挥重要作用, 它们表达水平的升高对肝细胞的恶性转化、HcPC干性的维持以及肿瘤细胞的迁移和侵袭均具有一定的促进作用。针对HcPC的研究有望为HCC早期诊断提供新的思路, 而通过阻止HcPC向HCC的恶性转化也有望成为一种治疗HCC的新方法。本文尝试对HcPC的发现过程、HcPC的主要来源、现有HcPC相关生物标志物等进行较为系统的综述, 期望有助于今后HcPC相关研究的深入开展。

[关键词] 肝细胞癌(HCC); 肿瘤发生; 肝癌祖细胞(HcPC)

[中图分类号] R735.7; R730.231 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)01-0074-08

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界范围内最常见的原发性肝恶性肿瘤, 是癌症导致人类死亡的第四大原因^[1]。随着医疗技术的日益进步, 人们的疾病负担不断减少, 但与之相反, 世界范围内肝癌的总体负担却在逐步增加^[2]。虽然HCC的病因尚未被完全阐明, 但乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染、酒精性肝病和非酒精性脂肪性肝病已被公认为是HCC发生的主要危险因素^[3]。有研究^[4]发现, 癌症起源于一小部分未分化的细胞, 这些细胞能够在癌变过程中自我更新并分化、增殖形成肿瘤细胞亚群, 被称为癌干细胞或肿瘤起始细胞。然而也有研究^[5]发现, HCC也可以起源于尚未完全恶化的祖细胞, 与癌干细胞及完全恶性的HCC细胞不同, 其只有在合适的微环境中(如肝受损)才能引发HCC。这些细胞被称为肝癌祖细胞(hepatocellular carcinoma progenitor cell, HcPC), 可能是肝癌干细胞的前身。自HcPC被发现以来, 围绕其研究层出不穷, 本文主要综述HcPC在肝癌发生中作用的研究进展。

1 HcPC的发现

HCC是一种缓慢发展的恶性肿瘤, 起病隐匿, 一旦出现明显症状, 病程常常已经进入中晚期。因此在大多数情况下, HCC患者一经诊断即为晚期, 失去进行根治性治疗的机会, 而目前此阶段可用的治疗方法仅在少数患者中有效^[6-7]。早期和晚期HCC之间有着巨大的预后差异。由于HCC的病因复杂且患病个体异质性很强, 因此在其早期即成功诊断的难度

很大^[8]。中国肝癌的5年总体生存率约为10%, 这在很大程度上反映出只有一部分患者能在肝癌早期阶段被诊断出, 并接受根治性治疗, 例如手术切除、经皮消融或肝移植等^[9-10]。不仅如此, 因为HCC具有很强的侵袭性, 患者的预后通常也较差^[11]。因此, 研究者们一直致力于寻找一种或几种在HCC发生阶段敏感特异的检测指标, 以期可以早发现、早治疗, 从而提高HCC患者的生存率。HcPC作为一种肿瘤起始细胞, 与其相关的分子标志物和信号转导途径为HCC发生阶段的早期检测和治疗指标的选择提供了重要方向。

为了探究HCC中是否存在HcPC, 研究者们建立了两种模型加以验证——使用二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)诱发HCC的小鼠模型, 以及转化生长因子 β 激活激酶1肝特异性敲除(TAK1 ^{Δ hep})小鼠模型, 并且在两种模型的HCC小鼠

[基金项目] 科技部十三五重大传染病专项课题(No. 2018ZX10732202-001, No. 2018ZX10302207-004); 国家自然科学基金资助项目(No. 81903184, No. 81902412)。Project supported by the State Key Projects for Infectious Diseases (No. 2018ZX10732202-001, No. 2018ZX10302207-004), and the National Natural Science Foundation of China (No. 81903184, No. 81902412)

[作者简介] 张杨倩雯(1997-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤信号转导研究, E-mail: zyqw1997@126.com

[通信作者] 陈磊(CHEN Lei, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤信号转导研究, E-mail: chenlei@smmu.edu.cn; 王红阳(WANG Hongyang, co-corresponding author), 博士, 主任医师、教授, 博士生导师, 中国工程院院士, 主要从事肿瘤基础与临床研究, E-mail: hywangk@vip.sina.com

中均成功分离出了HcPC,证实了HcPC的存在。两种模型的建立都有相应的理论支撑,且在一定程度上与人体病理生理情况相符。DEN是一种化学致癌物,它靶向肝,被肝小叶中心的肝细胞代谢活化后,诱发致癌突变,从而产生低分化的HCC结节,进而发展为HCC^[12]。有研究者^[13]对人类HCC基因组进行分析发现,HCC是复杂且具有高度异质性的恶性恶性肿瘤,通常表现出广泛的遗传和表观遗传变化,进而推测遗传物质突变的不断累积可能是HCC发生的基础。这与DEN的致癌原理相同。并且有研究^[14]表明,DEN诱导形成的小鼠肝肿瘤不仅在比较基因杂交谱(CGH)中与酒精性的人类肝肿瘤相似,其形态学变化也有共同之处。TAK1^{Δhep}小鼠是肝细胞特异性的TAK1缺失的小鼠,在此模型中,肝细胞内TAK1缺失,引起进行性的肝损伤,进而产生炎症和纤维化,最终自发形成HCC^[15]。这与大多数HCC患者的肿瘤进展过程是类似的。研究者们通过在大量患者和几种小鼠模型之间进行跨物种基因组学分析发现,TAK1^{Δhep}小鼠模型不仅可以更好地反映人类HCC的突变特征,并且在转录组学上与低恶性程度的人类肝肿瘤具有一定的相似性^[16]。尽管这两种模型的病因是不同的,但在两者中都成功地分离出了表达标志性基因的HcPC。

2 HcPC的来源

基于HcPC表达一些在正常肝细胞中并不表达的标志物,研究者们推测HcPC可能起源于变异肝细

胞病灶(foci of altered hepatocytes, FAH)或发育不良结节^[5,17]。实际上也确实是在FAH中分离出了大小与HcPC相似的、与周围组织细胞明显不同的细胞。对其进一步研究发现,这些细胞表达了几种通常由肝癌干细胞和卵圆细胞表达的分子标志物,如CD44、EpCAM、AFP、SOX9、OV6以及CK19等^[18-19]。将这些分离出的细胞移植到MUP-uPA小鼠体内,可以成功诱发HCC,证明这些细胞确实是HcPC。那HcPC究竟是从什么细胞经过怎样变化而来的呢?

通过转录组学分析表明,DEN诱导产生的HcPC与卵圆细胞和HCC细胞均有一定的相关性^[5]。鉴于DEN由仅在中央静脉区的成熟肝细胞中表达的细胞色素酶Cyp2E1代谢激活^[20],且DEN诱导产生的FAH也在相同区域被检测到,而不在卵圆细胞所处的胆管或Hering管内(图1),所以研究者认为DEN诱导产生的HcPC最有可能来自中央静脉区去分化的肝细胞。这个关于HcPC来源的结论也得到了其他研究组的支持。有研究^[21]发现,非酒精性脂肪性肝炎背景下发生的HCC也源自中央静脉区分化后的肝细胞。研究者通过建立不同的HCC小鼠模型并对其中各细胞进行谱系追踪来探究HcPC的来源。多个实验数据提供了多重证据,证明了在各种基因毒性和遗传突变导致的HCC模型中,HcPC仅来源于肝细胞(图1),而不是卵圆细胞或胆管细胞^[22]。这说明虽然HcPC具有祖细胞样特征,但并不意味着HcPC是祖细胞起源,相反,HcPC来源于肝细胞的去分化。

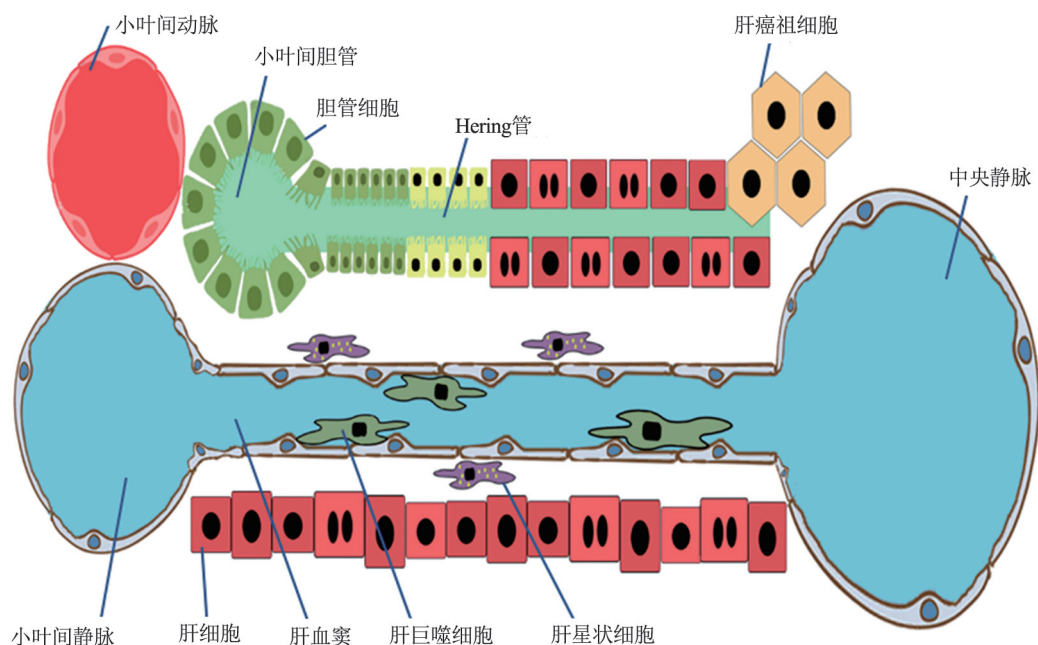


图1 肝癌祖细胞来源示意图

有学者使用多步肝癌发展模型,即从伴随局灶性结节性的增生发展到再生结节,再到非酒精性脂肪性肝炎,继而发展为肝细胞腺瘤,并最终发展为HCC的小鼠模型^[23],结合遗传谱系追踪和体外共培养细胞实验,证明了HCC主要来源于肝细胞和肝祖细胞的良性病变^[24]。还有其他研究组也得出了相同的结论,表明HcPC的来源似乎不仅只是肝细胞,还有双潜能肝癌祖细胞(卵圆细胞)参与其中^[25-26],这似乎与之前所得出的结论相悖。

另有研究者^[27]将目光聚集到了肝非实质细胞之上。之前的研究表明,肝星状细胞(图1)可能作为多能祖细胞发挥作用,产生功能性肝细胞和胆管细胞以补充肝实质。由此可推测,肝星状细胞或许可能是HcPC的来源。但通过谱系追踪排除了HCC源自肝星状细胞衍生的肝细胞的可能性,从而否定了这个猜测。而另有研究者通过研究慢性肝损伤过程中肝再生机制提出,增殖导管细胞和胆管来源的肝细胞或许是炎症相关HCC的起源细胞^[26,28-29],那么它们也有可能成为HcPC的来源。然而基因谱系追踪分析显示,HCC来源于肝细胞而非导管细胞^[22,30],也排除了此种可能性。

通过进一步研究发现,HcPC首先出现在新形成的异位淋巴样结构(ectopic lymphoid structure, ELS)中,然后迁移出来形成肿瘤^[31]。ELS是指在发生炎症反应的部位,由白细胞浸润形成简单的淋巴细胞聚集甚至更复杂的具有微结构的组织,其在组织学上类似于淋巴器官^[32]。ELS可以提供能够支持HcPC生长扩增和癌症发展的独特微环境,而研究表明肿瘤微环境在引发和维持癌变中起着重要的作用,中断其功能可能阻止HCC的发生^[33]。

3 HcPC的标志物及其在HCC发生中的作用

目前HCC的诊断方法包括临床诊断、影像学诊断、分子生物标志物诊断和组学诊断等^[9]。分子生物标志物诊断是最为常用的HCC检测方法之一。有研究者^[34]预测,在未来几年中,通过不断发展的大数据和高通量测序技术,基于生物标志物的精确筛选可能成为HCC早期检测的主要方法。找到在HCC发生阶段即出现的非侵袭性的新生物标志物将成为此领域内的研究热点^[35]。HcPC作为一种尚未完全恶化的祖细胞,其生物标志物为人们提供了一个很有潜力的研究方向。

迄今,已经发现了一些HcPC的生物标志物来将其与正常细胞进行区分,如CD44、EpCAM、SOX9、OV6和CK19等。

3.1 CD44

CD44是一种多结构、多功能的细胞表面糖蛋白,其作为透明质酸的受体,参与细胞增殖、迁移、归巢和血管生成等过程^[36]。在正常生理条件下,肝中仅有髓系细胞表达CD44,如肝巨噬细胞(库普弗细胞)和淋巴细胞^[37]。然而在恶性转化过程中,CD44在HcPC中的表达上调,这可进一步促进具有脂质蓄积的肝细胞的恶性转化^[38]。有研究^[39]发现,HCC的发生需要通过CD44增强的生长因子信号转导抑制p53的表达来实现。另一研究^[40]则证明,CD44可以通过正反馈通路调节Yes相关蛋白1(Yes-associated protein 1, YAP1),从而在HCC发生过程中发挥调控肿瘤细胞增殖和侵袭的作用。这些或许就是HcPC表面的CD44在HCC发生中起到的作用。

有研究^[41]发现,CD44可能通过NOTCH3信号转导途径参与HCC细胞中肿瘤干细胞的功能维持。另有研究^[42]表明,与CD133⁺CD44⁻细胞相比,CD133⁺CD44⁺的HCC细胞表现出更多的干细胞特性,例如广泛的增殖、自我更新和分化成后代肿瘤细胞的能力,以及对治疗药物更具抗性。并且,敲减CD44会导致HCC细胞的转移减少,可以抑制HCC细胞的侵袭和转移^[43]。而CD44的变体通过稳定xCT调控肿瘤细胞中的氧化还原状态,以保护其免受活性氧的影响,促进肿瘤的生长^[44]。也就是说,CD44在HCC发生中发挥作用,在HCC的发展中也可能起一定的作用。CD44表达水平的升高可能有助于肝细胞恶性转化和HCC的发生发展。

已有研究^[45]证明,CD44抗体介导的脂质体纳米颗粒可以通过特异性靶向CD44进入肝癌小鼠模型的肿瘤中,促进肿瘤细胞凋亡并抑制肿瘤生长。在所有来源于患者的HCC类器官模型中,CD44⁺的模型对HCC一线用药索拉非尼具有明显抗性,但将索拉非尼与Hedgehog信号通路抑制剂联合使用可能对CD44⁺的HCC患者有效,这可能成为一种个性化的治疗方法^[46]。另有研究组开发了整合阿霉素和小檗碱的偶联透明质酸的Janus纳米载体,通过CD44受体介导的靶向作用,将其运送到小鼠肿瘤之中,成功降低小鼠HCC的复发率,提供了一种有临床前景的治疗方法^[47]。

3.2 EpCAM

上皮细胞黏附分子(EpCAM)是I型穿膜糖蛋白,由一个单穿膜结构连接N端的胞外结构域和C端的胞内短片段组成^[48],在各种器官的上皮细胞中表达。在正常肝中,EpCAM在增殖导管细胞和胆管上皮细胞中表达,在成熟的肝细胞中不表达^[26]。但是EpCAM在部分亚型的HCC细胞以及HcPC细胞中均可以被检测到。研究发现,EpCAM⁺HCC细胞不仅表

现出独特的肝干/祖细胞的分子特征,还具有自我更新、分化和形成肿瘤的能力^[49-50]。并且,抑制EpCAM的表达将导致癌细胞的增殖减少^[51],降低肿瘤的转移率。在HBV感染的条件下,EpCAM是通过调控膜内蛋白的水解从而诱导激活经典的Wnt信号转导通路以及Wnt调控的肿瘤干细胞样特征基因的表达^[52]。这表明EpCAM通过激活Wnt/ β -连环蛋白信号活性来维持干细胞的特性。这或许就是EpCAM维持HcPC干性的机制。同时也有研究^[53]发现,在晚期肝硬化中分离出的EpCAM⁺的肿瘤干细胞样细胞,可通过自分泌Wnt信号从而自我激活并无限自我更新,有助于HCC的发生。总之,EpCAM的表达升高对HCC的发生和发展都起着一定的促进作用。此外,与EpCAM⁺肿瘤相比,EpCAM⁺的肿瘤患者具有更高的肿瘤复发率和更低的总体生存率^[54]。另有研究^[55]表明,EpCAM的高表达与患者肿瘤分化程度高以及预后不良有关。不仅是肿瘤中的EpCAM,肿瘤周围组织中的EpCAM也可能成为治愈性肝切除术后辅助治疗独立的预后评价指标^[56]。

目前,将EpCAM作为抗原的针对HCC的嵌合抗原受体工程化T(CAR-T)细胞的临床前研究正在进行^[57]。此外,有研究组提出将EpCAM当作抗原制备成针对HCC的树突状细胞(DC)疫苗,并结合标准化疗,可能在治疗晚期HCC患者时获得更好的临床疗效^[58]。另有研究组设计出了靶向CD133和EpCAM的脂质体,它能共同递送阿霉素和沙利霉素以协同抑制HCC的生长^[59]。而由环糊精介导的多孔RNA纳米球,包含用于沉默EpCAM基因的小干扰RNA以及抗肿瘤药物索拉非尼,其抗肿瘤的协同功效已在体外以及小鼠体内模型中得到验证^[60]。

3.3 SOX9

SOX蛋白家族是一组含有高度保守的HMG结构域的转录调节因子,参与哺乳动物的雄性性别决定^[61]。而其家族成员SOX9位于人17号染色体上一个大小约3 Mb且不含其他蛋白质编码基因的区域中^[62]。SOX9可以维持细胞在发育过程中的未分化状态,是一个干性基因^[63]。有研究^[64]发现,SOX9是维持肝内干性细胞增殖、自我更新和致瘤性所必需的,同时也发现肝内的非干性细胞中外源SOX9的过表达能够恢复其自我更新能力。这些有可能是SOX9在HcPC中发挥作用的机制之一。另有研究^[65]发现,SOX9⁺细胞具有自我更新和分化成SOX9⁻细胞的能力,并在异种移植到重症免疫缺陷小鼠中之后,以更高的概率形成较大的肝肿瘤。这意味着SOX9在HCC发生中发挥着关键作用。研究^[66-67]表明,沉默SOX9可以抑制HCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力,

抑制肿瘤形成,同时通过调节经典的Wnt途径赋予HCC细胞一定的抗药性。这表示SOX9在HCC发展过程中同样也发挥着一定作用。有研究者根据临床前数据分析发现,SOX9高表达的HCC患者总生存期较短,并且在肺癌、乳腺癌、胃癌和卵巢癌的患者中也得到了类似结果,说明SOX9具有广泛的预后意义^[68]。

研究^[69]表明,高表达SOX9的细胞对索拉非尼具有一定的抗性。靶向SOX9的ZNP/PEI/miR-34a纳米制剂可以显著抑制小鼠肝癌模型中肿瘤的生长,是一种安全有效的药物递送方式^[70]。

3.4 OV6

卵圆细胞出现在啮齿动物肝门静脉区的胆管和Hering管内(图1),这些细胞和它们的后代均具有增殖和分化成胆管细胞或肝细胞的能力^[71-72]。所以卵圆细胞也被称作双潜能干/祖细胞。OV6不仅是卵圆细胞的标志物,也在肝干细胞中表达^[73]。在HcPC被发现前,有研究组已经筛选出了OV6⁺的肿瘤起始细胞,并发现其在体内外均表现出强烈的侵袭和转移潜能,有助于HCC的进展和转移^[74]。HcPC就是一种OV6⁺的肿瘤起始细胞。另有研究^[75]发现,与OV6细胞相比,OV6⁺细胞具有更强的在体内形成肿瘤的能力并且对标准化疗具有显著抗性。此外,OV6的高表达还与HCC患者的预后不良有关,具有一定的预后意义^[76]。

3.5 CK19

CK19是一类较小的、约4万分子量的I型细胞角蛋白,它缺乏细胞角蛋白中常见的尾部结构域^[77]。在正常肝中,胆管细胞表达CK19而成熟的肝细胞不表达^[78]。所以其一般作为终末胆管标志物,同时也是细胞干性的相关标志物^[79]。有研究组通过分析证明,CK19的表达与肿瘤大小、转移和侵袭均有显著相关性,并且CK19⁺HCC细胞在体外培养时表现出明显增强的侵袭性以及对化疗药物的抵抗性^[80]。另一研究^[81]也发现,CK19可通过上调EMT相关基因获得更多侵袭潜能。这说明CK19对维持HcPC的干性以及HCC的发生、发展均起一定作用。而CK19的表达或与CK19表达相关的特征也已成为肝移植术后HCC复发和存活的预测指标^[82-83]。

仅对单一分子生物标志物进行检测可能并不是对HCC,尤其是对早期HCC诊断最敏感和特异的方法。联合多种分子生物标志物,对其进行高通量检测可能成为未来切实有效的HCC早筛方式。

4 结 语

目前,肿瘤起始细胞的起源依然是一个存在争

议的研究热点, 研究者的观点还不完全一致。有研究者认为, 肿瘤起源于正常组织中成熟细胞在某些条件下发生的去分化, 由此重新获得干性潜能, 并最终发展为肿瘤。如文中所述的HcPC, 就被认为是成熟肝细胞去分化衍生而成, 在炎性环境下即发展成HCC。那么, 从调控HcPC所处的环境条件(如炎症)着手, 将其恶性转化的途径阻断从而达到治疗的目的, 这种方法是否更容易、更有效、更具有潜在的临床应用价值? 还有待进一步的研究。而另一部分研究者则认为, 肿瘤起源于正常组织中所存在的肿瘤干细胞(如肝癌干细胞), 其本身即具有自我更新、增殖、分化成HCC的能力。还有其他研究者发现, 肝祖细胞和增殖导管细胞在某些环境下也可以作为HCC起始细胞。虽然各种观点都有一定的理论和数据支持, 但是可能受限于使用的动物模型、临床样本以及研究方法的不同, 从而得出不同的结论。下一阶段应结合最新的技术, 例如谱系追踪、单分子可视化技术和单细胞多组学技术等在新的动物模型以及更大临床队列的基础上开展相关研究, 从而探明HCC起始细胞的真正起源。然而, HCC起始细胞也有可能本身就在不同的条件下存在有不同的起源, 而阐明其背后的异质化起源机制, 也是值得关注的研究方向。期望今后通过对肿瘤起始细胞的深入研究, 为临床早期诊断和干预HCC发生提供新策略和新方法。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management [J/OL]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6813818/>. DOI:10.1038/s41575-019-0186-y.
- [3] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1450-1462. DOI:10.1056/nejmra1713263.
- [4] ZHI X S, XIONG J, ZI X Y, et al. The potential role of liver stem cells in initiation of primary liver cancer[J]. *Hepatol Int*, 2016, 10(6): 893-901. DOI:10.1007/s12072-016-9730-9.
- [5] HE G B, DHAR D, NAKAGAWA H, et al. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling[J/OL]. *Cell*, 2013, 155(2): 384-396[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4015514/>. DOI:10.1016/j.cell.2013.09.031.
- [6] DAHER S, MASSARWA M, BENSON A A, et al. Current and future treatment of hepatocellular carcinoma: an updated comprehensive review[J/OL]. *J Clin Transl Hepatol*, 2018, 6(1): 69-78[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5863001/>. DOI: 10.14218/JCTH.2017.00031.
- [7] KUMARI R, SAHU M K, TRIPATHY A, et al. Hepatocellular carcinoma treatment: hurdles, advances and prospects[J]. *Hepat Oncol*, 2018, 5(2): HEP08. DOI:10.2217/hep-2018-0002.
- [8] FU J, WANG H Y. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China[J]. *Cancer Lett*, 2018, 412: 283-288. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.10.008.
- [9] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314. DOI: 10.1016/s0140-6736(18)30010-2.
- [10] YARCHOAN M, AGARWAL P, VILLANUEVA A, et al. Correction: recent developments and therapeutic strategies against hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(22): 5897. DOI:10.1158/0008-5472.can-19-2958.
- [11] KULIK L, EL-SERAG H B. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(2): 477-491.e1. DOI:10.1053/j.gastro.2018.08.065.
- [12] VERNA L, WHYSNER J, WILLIAMS G M. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation[J]. *Pharmacol Ther*, 1996, 71(1/2): 57-81. DOI:10.1016/0163-7258(96)00062-9.
- [13] CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. ELECTRONIC ADDRESS: WHEELER@BCM.EDU, CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Cell*, 2017, 169(7): 1327-1341. e23[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5680778/>. DOI:10.1016/j.cell.2017.05.046.
- [14] FRIEMEL J, FRICK L, UNGER K, et al. Characterization of HCC mouse models: towards an etiology-oriented subtyping approach[J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(7): 1493-1502. DOI:10.1158/1541-7786.mcr-18-1045.
- [15] INOKUCHI S, AOYAMA T, MIURA K, et al. Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(2): 844-849[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2818947/>. DOI:10.1073/pnas.0909781107.
- [16] DOW M, PYKE R M, TSUI B Y, et al. Integrative genomic analysis of mouse and human hepatocellular carcinoma[J/OL]. *PNAS*, 2018, 115(42): E9879-E9888[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/30287485/>. DOI:10.1073/pnas.1811029115.
- [17] PITOT H C. Altered hepatic foci: their role in murine hepatocarcinogenesis[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1990, 30: 465-500. DOI: 10.1146/annurev.pa.30.040190.002341.
- [18] WANG N Z, WANG S S, LI M Y, et al. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: an overview and promising therapeutic strategies[J/OL]. *Ther Adv Med Oncol*, 2018, 10: 1758835918816287 [2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6304707/>. DOI:10.1177/1758835918816287.
- [19] QIU L G, LI H L, FU S R, et al. Surface markers of liver cancer stem cells and innovative targeted-therapy strategies for HCC[J/OL]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 2039-2048[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5776936/>. DOI: 10.3892/ol.2017.7568.
- [20] TSUTSUMI M, LASKER J M, SHIMIZU M, et al. The intralobular distribution of ethanol-inducible P450IIE1 in rat and human liver[J].

- Hepatology, 1989, 10(4): 437-446. DOI:10.1002/hep.1840100407.
- [21] FONT-BURGADA J, SHALAPOUR S, RAMASWAMY S, et al. Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer[J]. *Cell*, 2015, 162(4): 766-779. DOI:10.1016/j.cell.2015.07.026.
- [22] MU X, ESPAÑOL-SUÑER R, MEDERACKE I, et al. Hepatocellular carcinoma originates from hepatocytes and not from the progenitor/biliary compartment[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(10): 3891-3903. DOI: 10.1172/jci77995.
- [23] FEBBRAIO M A, REIBE S, SHALAPOUR S, et al. Preclinical models for studying NASH-driven HCC: how useful are they? [J/OL]. *Cell Metab*, 2019, 29(1): 18-26[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6326872/>. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.10.012.
- [24] TUMMALA K S, BRANDT M, TEIJEIRO A, et al. Hepatocellular carcinomas originate predominantly from hepatocytes and benign lesions from hepatic progenitor cells[J/OL]. *Cell Rep*, 2017, 19(3): 584-600[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5409928/>. DOI:10.1016/j.celrep.2017.03.059.
- [25] SIA D, VILLANUEVA A, FRIEDMAN S L, et al. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4): 745-761. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.11.048.
- [26] MATSUMOTO T, TAKAI A, ESO Y, et al. Proliferating EpCAM-positive ductal cells in the inflamed liver give rise to hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(22): 6131-6143. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-17-1800.
- [27] KORDES C, SAWITZA I, GÖTZE S, et al. Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(12): 5503-5515. DOI:10.1172/jci74119.
- [28] TIRNITZ-PARKER J E E, FORBES S J, OLYNYK J K, et al. Cellular plasticity in liver regeneration: spotlight on cholangiocytes[J]. *Hepatology*, 2019, 69(5): 2286-2289. DOI:10.1002/hep.30340.
- [29] ALEKSIEVA N, FORBES S J. Biliary-derived hepatocytes in chronic liver injury: Bringing new troops to the battlefield? [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(6): 1051-1053. DOI:10.1016/j.jhep.2019.03.015.
- [30] SHIN S, WANGENSTEEN K J, TETA-BISSETT M, et al. Genetic lineage tracing analysis of the cell of origin of hepatotoxin-induced liver tumors in mice[J/OL]. *Hepatology*, 2016, 64(4): 1163-1177[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5033674/>. DOI:10.1002/hep.28602.
- [31] FINKIN S, YUAN D T, STEIN I, et al. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Nat Immunol*, 2015, 16(12): 1235-1244[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4653079/>. DOI:10.1038/ni.3290.
- [32] SAUTÈS-FRIDMAN C, PETITPREZ F, CALDERARO J, et al. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(6): 307-325. DOI: 10.1038/s41568-019-0144-6.
- [33] WU Q, ZHOU L Y, LV D, et al. Exosome-mediated communication in the tumor microenvironment contributes to hepatocellular carcinoma development and progression[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 53[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6542024/>. DOI:10.1186/s13045-019-0739-0.
- [34] LIU X N, CUI D N, LI Y F, et al. Multiple "Omics" data-based biomarker screening for hepatocellular carcinoma diagnosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(30): 4199-4212. DOI:10.3748/wjg.v25.i30.4199.
- [35] LUO P, WU S Y, YU Y L, et al. Current status and perspective biomarkers in AFP negative HCC: towards screening for and diagnosing hepatocellular carcinoma at an earlier stage[J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 599-603. DOI:10.1007/s12253-019-00585-5.
- [36] MORATH I, HARTMANN T N, ORIAN-ROUSSEAU V. CD44: More than a mere stem cell marker[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 81(Pt A): 166-173. DOI:10.1016/j.biocel.2016.09.009.
- [37] FLANAGAN B F, DALCHAU R, ALLEN A K, et al. Chemical composition and tissue distribution of the human CDw44 glycoprotein[J/OL]. *Immunology*, 1989, 67(2): 167-175[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1385252/>.
- [38] FANG M, YAO M, YANG J, et al. Abnormal CD44 activation of hepatocytes with nonalcoholic fatty accumulation in rat hepatocarcinogenesis[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2020, 12(1): 66-76. DOI:10.4251/wjgo.v12.i1.66.
- [39] DHAR D, ANTONUCCI L, NAKAGAWA H, et al. Liver cancer initiation requires p53 inhibition by CD44-enhanced growth factor signaling[J/OL]. *Cancer Cell*, 2018, 33(6): 1061-1077.e6[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6005359/>. DOI:10.1016/j.ccell.2018.05.003.
- [40] FAN Z H, XIA H W, XU H J, et al. Standard CD44 modulates YAP1 through a positive feedback loop in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 147-156. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.042.
- [41] ASAI R, TSUCHIYA H, AMISAKI M, et al. CD44 standard isoform is involved in maintenance of cancer stem cells of a hepatocellular carcinoma cell line[J/OL]. *Cancer Med*, 2019, 8(2): 773-782[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6382709/>. DOI:10.1002/cam4.1968.
- [42] ZHU Z, HAO X F, YAN M X, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133⁺CD44⁺ population in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(9): 2067-2078. DOI:10.1002/ijc.24868.
- [43] GAO Y, RUAN B, LIU W, et al. Knockdown of CD44 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo by reversing epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 7828-7837. DOI:10.18632/oncotarget.3488.
- [44] ISHIMOTO T, NAGANO O, YAE T, et al. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(3): 387-400. DOI:10.1016/j.ccr.2011.01.038.
- [45] WANG L, SU W J, LIU Z, et al. CD44 antibody-targeted liposomal nanoparticles for molecular imaging and therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(20): 5107-5114. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.03.067.
- [46] WANG S, WANG Y, XUN X, et al. Hedgehog signaling promotes sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma patient-derived organoids[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 22. DOI:10.1186/s13046-020-1523-2.
- [47] ZHANG F, JIA Y, ZHENG X, et al. Janus nanocarrier-based co-delivery of doxorubicin and berberine weakens chemotherapy-

- exacerbated hepatocellular carcinoma recurrence[J]. *Acta Biomater*, 2019, 100: 352-364. DOI:10.1016/j.actbio.2019.09.034.
- [48] HUCH M, DOLLÉ L. The plastic cellular states of liver cells: Are EpCAM and Lgr5 fit for purpose?[J/OL]. *Hepatology*, 2016, 64(2): 652-662[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4973669/>. DOI:10.1002/hep.28469.
- [49] YAMASHITA T, FORGUES M, WANG W, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1451-1461. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-07-6013.
- [50] YAMASHITA T, JI J F, BUDHU A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features[J/OL]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012-1024. e4[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2828822/>. DOI:10.1053/j.gastro.2008.12.004.
- [51] KIMURA O, TAKAHASHI T, ISHII N, et al. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)⁺ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(10): 2145-2155. DOI:10.1111/j.1349-7006.2010.01661.x.
- [52] MANI S K, ZHANG H, DIAB A, et al. EpCAM-regulated intramembrane proteolysis induces a cancer stem cell-like gene signature in hepatitis B virus-infected hepatocytes[J/OL]. *J Hepatol*, 2016, 65(5): 888-898[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5289705/>. DOI:10.1016/j.jhep.2016.05.022.
- [53] KHOSLA R, RASTOGI A, RAMAKRISHNA G, et al. EpCAM⁺ liver cancer stem-like cells exhibiting autocrine wnt signaling potentially originate in cirrhotic patients[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(3): 807-818. DOI:10.1002/sctm.16-0248.
- [54] NOH C K, WANG H J, KIM C M, et al. EpCAM as a predictive marker of tumor recurrence and survival in patients who underwent surgical resection for hepatocellular carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(7): 4101-4109. DOI:10.21873/anticancer.12700.
- [55] KO C, LI C, WU M Y, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule as a predictor of poor outcome in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 4810-4816. DOI:10.3892/etm.2018.6794.
- [56] DAI X M, HUANG T, YANG S L, et al. Peritumoral EpCAM is an independent prognostic marker after curative resection of HBV-related hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Dis Markers*, 2017, 2017: 8495326[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5442434/>. DOI:10.1155/2017/8495326.
- [57] CHEN Y, E C Y, GONG Z W, et al. Chimeric antigen receptor-engineered T-cell therapy for liver cancer[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2018, 17(4): 301-309. DOI:10.1016/j.hbpd.2018.05.005.
- [58] CHOI Y J, PARK S J, PARK Y S, et al. EpCAM peptide-primed dendritic cell vaccination confers significant anti-tumor immunity in hepatocellular carcinoma cells[J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190638[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752035/>. DOI:10.1371/journal.pone.0190638.
- [59] WANG Z H, SUN M Q, LI W, et al. A novel CD133- and EpCAM-targeted liposome with redox-responsive properties capable of synergistically eliminating liver cancer stem cells[J/OL]. *Front Chem*, 2020, 8: 649[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7431664/>. DOI:10.3389/fchem.2020.00649.
- [60] CHEN X X, CHEN T S, ZHANG L L, et al. Cyclodextrin-mediated formation of porous RNA nanospheres and their application in synergistic targeted therapeutics of hepatocellular carcinoma[J]. *Biomaterials*, 2020, 261: 120304. DOI:10.1016/j.biomaterials.2020.120304.
- [61] SINCLAIR A H, BERTA P, PALMER M S, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif[J]. *Nature*, 1990, 346(6281): 240-244. DOI:10.1038/346240a0.
- [62] SYMON A, HARLEY V. SOX9: a genomic view of tissue specific expression and action[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 87: 18-22. DOI:10.1016/j.biocel.2017.03.005.
- [63] KADAJA M, KEYES B E, LIN M Y, et al. SOX9: a stem cell transcriptional regulator of secreted niche signaling factors[J/OL]. *Genes Dev*, 2014, 28(4): 328-341[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3937512/>. DOI:10.1101/gad.233247.113.
- [64] LIU C G, LIU L M, CHEN X J, et al. Sox9 regulates self-renewal and tumorigenicity by promoting symmetrical cell division of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 117-129. DOI:10.1002/hep.28509.
- [65] KAWAI T, YASUCHIKA K, ISHII T, et al. SOX9 is a novel cancer stem cell marker surrogated by osteopontin in human hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30489[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4960550/>. DOI: 10.1038/srep30489.
- [66] LEUNG C O, MAK W N, KAI A K, et al. Sox9 confers stemness properties in hepatocellular carcinoma through Frizzled-7 mediated Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 29371-29386. DOI:10.18632/oncotarget.8835.
- [67] ZHANG W, WU Y, HOU B, et al. A SOX9-AS1/miR-5590-3p/SOX9 positive feedback loop drives tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(10): 2194-2210. DOI:10.1002/1878-0261.12560.
- [68] RICHTIG G, AIGELSREITER A, SCHWARZENBACHER D, et al. SOX9 is a proliferation and stem cell factor in hepatocellular carcinoma and possess widespread prognostic significance in different cancer types [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187814[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5679634/>. DOI:10.1371/journal.pone.0187814.
- [69] WANG M C, WANG Z H, ZHI X S, et al. SOX9 enhances sorafenib resistance through upregulating ABCG2 expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110315. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110315.
- [70] SALAH Z, ABD EL AZEEM E M, YOUSSEF H F, et al. Effect of tumor suppressor miR-34a loaded on ZSM-5 nanozeolite in hepatocellular carcinoma: in vitro and in vivo approach[J]. *Curr Gene Ther*, 2019, 19(5): 342-354. DOI: 10.2174/1566523219666191108103739.
- [71] EVARTS R P, NAGY P, NAKATSUKASA H, et al. In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(6): 1541-1547.
- [72] NOVIKOFF P M, YAM A, OIKAWA I. Blast-like cell compartment in carcinogen-induced proliferating bile ductules[J]. *Am J Pathol*, 1996, 148(5): 1473-1492.
- [73] SELL S, DUNSFORD H A. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma[J/OL]. *Am J*

- Pathol, 1989, 134(6): 1347-1363[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1879951/>.
- [74] YANG W, WANG C, LIN Y, et al. OV6⁺ tumor-initiating cells contribute to tumor progression and invasion in human hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3): 613-620. DOI:10.1016/j.jhep.2012.04.024.
- [75] YANG W, YAN H X, CHEN L, et al. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4287-4295. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-07-6691.
- [76] ZHU J H, YU H, CHEN S Z, et al. Prognostic significance of combining high mobility group Box-1 and OV-6 expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(8): 912-923. DOI:10.1007/s11427-017-9188-x.
- [77] BRAGULLA H H, HOMBERGER D G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia[J]. *J Anat*, 2009, 214(4): 516-559. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x.
- [78] ROSKAMS T, DE VOS R, VAN EYKEN P, et al. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man[J]. *J Hepatol*, 1998, 29(3): 455-463. DOI:10.1016/S0168-8278(98)80065-2.
- [79] LEE K, LEE K B, JUNG H Y, et al. The correlation between poor prognosis and increased yes-associated protein 1 expression in keratin 19 expressing hepatocellular carcinomas and cholangiocarcinomas[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 441. DOI:10.1186/s12885-017-3431-1.
- [80] GOVAERE O, KOMUTA M, BERKERS J, et al. Keratin 19: a key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas[J/OL]. *Gut*, 2014, 63(4): 674-685[2020-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3963546/>. DOI:10.1136/gutjnl-2012-304351.
- [81] KIM H, CHOI G H, NA D C, et al. Human hepatocellular carcinomas with "Stemness" -related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis[J]. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1707-1717. DOI:10.1002/hep.24559.
- [82] MILTIADOUS O, SIA D, HOSHIDA Y, et al. Progenitor cell markers predict outcome of patients with hepatocellular carcinoma beyond Milan criteria undergoing liver transplantation[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(6): 1368-1377. DOI:10.1016/j.jhep.2015.07.025.
- [83] RHEE H, NAHM J H, KIM H, et al. Poor outcome of hepatocellular carcinoma with stemness marker under hypoxia: resistance to transarterial chemoembolization[J]. *Mod Pathol*, 2016, 29(9): 1038-1049. DOI:10.1038/modpathol.2016.111.

[收稿日期] 2020-11-15

[修回日期] 2020-12-07

[本文编辑] 党瑞山